

**MÖGLICHKEITEN DER IMMUNSUPPRESSION
DURCH VITAMIN-B₆-MANGEL:
EINE EXPERIMENTELLE STUDIE
MIT HAUTTRANSPLANTATEN
AN INZUCHTMÄUSEN**

Rainer Baumgärtner

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555611_0087

Aus der I. Medizinischen Klinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr.med. H. SCHWIEGK

MÖGLICHKEITEN DER IMMUNSUPPRESSION DURCH VITAMIN-B₆-MANGEL:
EINE EXPERIMENTELLE STUDIE MIT HAUTTRANSPLANTATEN AN
INZUCHTMÄUSEN

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig - Maximilians - Universität zu München



vorgelegt von

Rainer Baumgärtner

aus

München

München 1976

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität
München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr.med. H. Dobbelsstein

Mitberichterstatter: Prof. Dr.med. H. Schwiegl

Dekan: Prof. Dr.med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 27.4.76



Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. <u>Einleitung</u>	1
2. <u>Methoden</u>	4
2.1. Versuchstiere	4
2.2. Futter	4
2.2.1. Zusammensetzung des Standardfutters	4
2.2.2. Zusammensetzung des pyridoxinfreien Futters	6
2.3. Vitamin-B ₆ -Substitution	7
2.4. 4'-Desoxypyridoxol	7
2.5. Hauttransplantationen	8
2.6. Vitamin-B ₆ -Status	13
2.6.1. Vitamin-B ₆ -Bestimmung	13
2.6.2. EGOT-Bestimmung	13
2.6.3. Entnahme und Verarbeitung des Mäusebluts	13
2.7. Milzzellsuspension	15
2.8. Statistische Auswertung	16
3. <u>Experimente</u>	18
3.1. Versuch I - Nahrungsrestriktion	18
3.1.1. Fragestellung	18
3.1.2. Präoperative Behandlung und Transplantation	18
3.1.3. Postoperative Behandlung und Verlauf	19
3.1.4. Ergebnisse	20
3.1.5. Statistische Auswertung	21
3.2. Versuch II - Alimentärer Vitamin-B ₆ -Mangel	23
3.2.1. Fragestellung	23
3.2.2. Präoperative Behandlung und Transplantation	23
3.2.3. Postoperative Behandlung und Verlauf	23
3.2.4. Vitamin-B ₆ -Status	24
3.2.5. Ergebnisse	25
3.2.6. Statistische Auswertung	25
3.3. Versuch III - Alimentärer Vitamin-B ₆ -Mangel	27
3.3.1. Fragestellung	27

	Seite
3.3.2. Präoperative Behandlung und Transplantation	27
3.3.3. Postoperative Behandlung und Verlauf	27
3.3.4. Vitamin-B ₆ -Status	28
3.3.5. Ergebnisse	29
3.3.6. Statistische Auswertung	29
3.4. Versuch IV - Milzzelleninjektionen bei Vitamin-B ₆ -Mangel nach Applikation v. 4'-Desoxypyridoxol	32
3.4.1. Fragestellung	32
3.4.2. Präoperative Behandlung und Transplantation	32
3.4.3. Postoperative Behandlung und Verlauf	34
3.4.4. Vitamin-B ₆ -Status	34
3.4.5. Ergebnisse	35
3.5. Versuch V - Protrahierter Pyridoxinmangel	37
3.5.1. Fragestellung	37
3.5.2. Präoperative Behandlung und Transplantation	38
3.5.3. Postoperative Behandlung und Verlauf	39
3.5.4. Vitamin-B ₆ -Status	42
3.5.5. Ergebnisse	42
3.5.6. Statistische Auswertung	43
4. <u>Diskussion</u>	46
4.1. Hunger	46
4.2. Vitamin-B ₆ -Mangel	48
4.2.1. Alimentärer Pyridoxinmangel	49
4.2.2. 4'-Desoxypyridoxol	49
4.3. Milzzellen	51
4.4. Vitamin-B ₆ -Status	52
4.5. Technische Einflüsse	53
4.6. Urämie	54
4.7. Ausblick	55
5. <u>Zusammenfassung</u>	56
<u>Literaturverzeichnis</u>	57

1. Einleitung

Bald nach der Entdeckung und Darstellung der verschiedenen Formen des Vitamin B₆, Pyridoxal, Pyridoxol und Pyridoxamin zeigte sich, daß diese Substanzen im Immunsystem zahlreicher

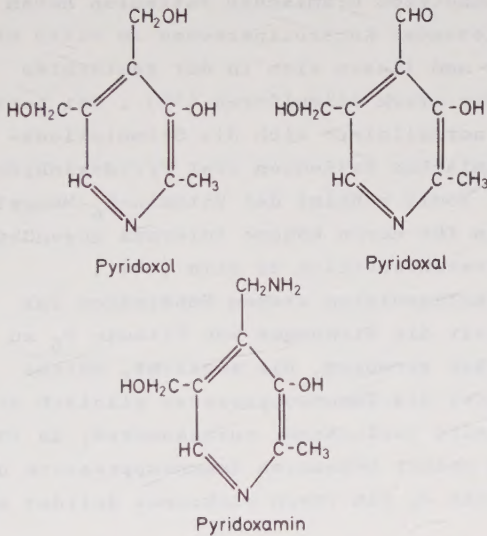


Abbildung 1

Tierarten eine wichtige Rolle spielen. Aus vielen Experimenten ergab sich, daß die inadäquate Versorgung des tierischen Organismus mit Vitamin B₆ neben Störungen anderer Organsysteme eine erhebliche Suppression sowohl der humoralen Antikörper als auch der zellulären Immunität hervorrufen kann (1, 6, 20, 25, 28, 40, 51, 55).

Klinische Bedeutung kommt diesen Befunden möglicherweise durch die Untersuchungen von DOBBELSTEIN zu. Er wies nach, daß bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ein biochemisch nachweisbarer Vitamin-B₆-Mangel besteht (14) . Urämische Patienten leiden an verminderter Infektoresistenz und zeigen abgeschwächte Immunreaktionen vom verzögerten Typ: u.a. tolerieren sie Fremdgewebstransplantate oft lange Zeit (9, 12, 44) . Die Lymphocyten urämischer Patienten haben im Gegensatz zu denen gesunder Kontrollpersonen in vitro eine verminderte Lebensdauer und lassen sich in der gemischten Lymphocytenkultur weniger stark stimulieren (13) . Bei bestehendem Pyridoxinmangel normalisiert sich die Stimulationsfähigkeit, wenn den urämischen Patienten oral Pyridoxinhydrochlorid zugeführt wird. Somit scheint der Vitamin-B₆-Mangel bei urämischen Patienten für deren höhere Toleranz gegenüber Organtransplantaten mitverantwortlich zu sein (14) . In Form der Vitamin-B₆-Antagonisten stehen Substanzen zur Verfügung, welche selektiv die Wirkungen von Vitamin B₆ zu vermindern oder aufzuheben vermögen. Die Aussicht, solche Stoffe vielleicht dereinst als Immunsuppressiva klinisch einsetzen zu können, erscheint verlockend, insbesondere, da für sie im Gegensatz zu den bisher bekannten Immunsuppressiva und Antimetaboliten im Vitamin B₆ ein rasch wirksames Antidot zur Verfügung stünde.

In unseren Experimenten sollte der Einfluß von unterschiedlich induzierten Vitamin-B₆-Mangelzuständen auf das Immunsystem untersucht werden. Als Versuchstier wählten wir die Maus. Von dieser Spezies gibt es ingezüchtete, reinrassige Stämme. Somit werden Versuchsbedingungen reproduzierbar und unsere Befunde lassen sich mit den Ergebnissen anderer Untersucher vergleichen.

Die Auswirkungen unserer verschiedenen experimentellen Maßnahmen beurteilten wir an Hand des Verhaltens von homologen Hauttransplantaten. Standardisierte Technik, relativ einfache Beurteilungsmöglichkeit, hohe Empfindlichkeit sowie die Möglichkeit, in kurzer Zeit größere Serien anzufertigen, sind ihre wesentlichen Merkmale.

2. Methoden

2.1. Versuchstiere

Bei unseren Versuchen verwendeten wir Mäuse der Stämme C57B1/6J und 129J ¹⁾, die wir je nach Versuchsanordnung in Einzel- oder Sammelkäfigen aus Plexiglas hielten. Sowohl die experimentellen als auch die der Kontrolle dienenden Tiere waren stets gleichen äußeren Einflüssen, insbesondere gleicher Lufttemperatur (vgl. 4.5.) ausgesetzt. Für die ideale Luftfeuchtigkeit sorgte ein dauernd betriebener Luftbefeuchter. Als Trinkwasser verwendeten wir Leitungswasser, welches den Tieren stets ad libitum zur Verfügung stand.

2.2. Futter

2.2.1. Zusammensetzung des gepreßten Standardfutters²⁾

55.0 % Futtergetreide:	33.0 % Gerste
	12.0 % Weizen
	10.0 % Mais

8.0 % Haferflocken

6.9 % Sojaschrot, extr.

6.1 % Fischmehl

5.0 % Weizenkleie

4.0 % Tapiokawurzeln, zerkl.

3.0 % Weizenkeime

3.0 % Mineralstoffmischung

91.0 % Übertrag

1) Jackson Laboratory. Bar Harbor, Maine 04609. USA

2) H. Eggersmann KG, 326 Rintelen/Weser

91.0 % Übertrag

2.0 % Fischpreßsaft, getr.

2.0 % Preßhilfsmittel Ligninsulfonat

1.5 % Luzernegrünmehl

1.0 % Melasse

1.0 % Dorschmehl

1.0 % Magermilchpulver

0.5 % Vitaminvormischung

100.0 %

=====

Wirkstoffzusatz je kg Fertigfutter

Vitamin A	40.000 I.E.	Fe	.	180.0 mg
Vitamin D 3	5.000 I.E.	Mn	.	37.5 mg
Vitamin E	40 mg	Zn	.	30.0 mg
Vitamin B ₁	15 mg	Cu	.	7.5 mg
Vitamin B ₂	20 mg	Co	.	375.0 mcg
Vitamin B ₆	5 mg	J	.	60.0 mcg
Vitamin B ₁₂	50 mcg			
Nikotinsäure	60 mg			
Pantothensäure	80 mg			
Cholinchlorid	600 mg			
Biotin	50 mcg			
Vitamin C	200 mg			
Vitamin K ₃	3 mg			
Folsäure	2 mg			

2.2.2. Zusammensetzung des Vitamin-B₆-freien Futters ¹⁾ (24)

Vitaminfreies Kasein	30.0 %
Sucrose	28.0 %
Stärkemehl	28.0 %
Maisöl	2.0 %
Baumwollsaamenöl	6.0 %
Faserstoffe	2.0 %
Hawk Oser Mineralstoffmischung	4.0 %

Wirkstoffzusatz je kg Fertigfutter

Cholindihydrogencitrat	2.000	mg
Inosit	100	mg
p-Aminobenzoessäure	5	mg
Nikotinsäure	20	mg
Vitamin K	5	mg
Thiamin-HCl	3	mg
Biotin	0.1	mg
Riboflavin	5	mg
Pantothensäure	25	mg
Folsäure	2	mg
Vitamin B ₁₂	0.02	mg
Vitamin E	165	mg
Vitamin D	20.000	I.E.
Vitamin A	200.000	I.E.

1) Nutritional Biochemicals Co., Cleveland Ohio . USA .

2.3. Vitamin-B₆-Substitution

In einigen Versuchen mußten wir Mäusen, die als Kontrolltiere dienten und mit Vitamin-B₆-freiem Futter ernährt worden waren, Vitamin B₆ zuführen. Zu diesem Zweck setzten wir dem Trinkwasser Pyridoxinhydrochlorid zu. Die Dosis war so berechnet, daß jede Maus bei einer durchschnittlichen Trinkmenge von 25 ml/Woche bis zur zehnfachen Menge des wöchentlichen Vitaminbedarfs von 10 µg aufnahm. Zum Schutz des Vitamins gegen Inaktivierung durch Tageslicht umhüllten wir die lichtdurchlässigen Kunststoffwasserflaschen mit Aluminiumfolie.

2.4. 4'-Desoxypyridoxol

Zur rascheren Erzeugung eines manifesten Vitamin-B₆-Mangels verabreichten wir den Mäusen neben dem Vitaminmangelfutter 4^Δ Desoxypyridoxol (Merck) .

Bei dieser, zum Pyridoxol strukturanalogen Substanz, steht anstelle der zur Wirksamkeit des Vitamin B₆ notwendigen 4^Δ Hydroxymethylgruppe eine Methylgruppe. Obwohl 4^Δ Desoxypyridoxol ein klassischer Vertreter aus der Gruppe der Vitamin-B₆-Antagonisten ist und von allen entsprechenden Substanzen die am gründlichsten erforschte ist, herrscht über seinen eigentlichen Wirkungsmechanismus noch keine vollständige Klarheit.

Wir applizierten den Mäusen 4^Δ Desoxypyridoxol, in physiologischer Kochsalzlösung in einer Konzentration von 0.1 mg/ml gelöst, und bakterienfrei filtriert, in einer Dosis von täglich 100 µg/ 100 g Körpergewicht intraperitoneal.

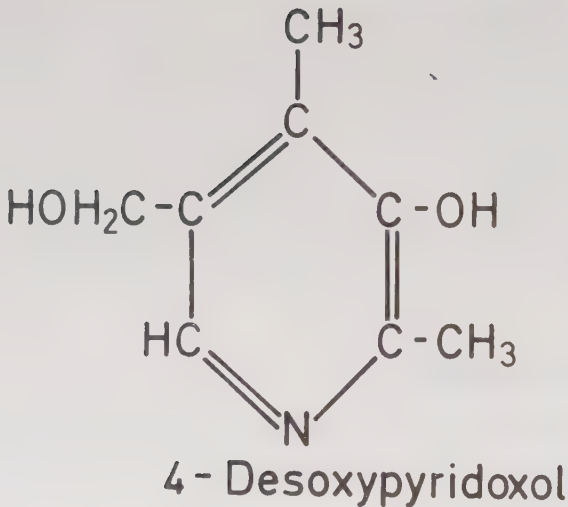


Abbildung 2

2.5. Hauttransplantation

Abgesehen von einer geringfügig modifizierten Verbandstechnik bedienten wir uns bei den Transplantationen der von THOENES angegebenen Methode (54).

Die ausgewachsenen Spendertiere wurden durch Genickbruch getötet, mit einer elektrischen Haarschneidemaschine gründlich geschoren und anschließend mit Spiritus dilutus kurz abgewaschen. Ausgehend von einem Längsschnitt durch die Bauchhaut zogen wir den Mäusen die Haut in einem Stück ab. Diese spannten wir, mit der Innenseite nach oben, mittels starker Nadeln auf ein Holzbrett. Sodann schabten wir mit einem

Skalpell das gesamte subkutane Fett- und Muskelgewebe ab. Um eine Austrocknung der präparierten Mäusehäute zu verhindern, feuchteten wir sie mit physiologischer Kochsalzlösung an. Mit einem frisch geschärften Korkstecher wurden nun kreisrunde Stückchen aus der Mäusehaut gestochen (Durchmesser ca. 11 mm). Aus der Haut einer 20 Gramm schweren Maus ließen sich auf diese Weise ca. 15 Transplantate gewinnen. Bis zu ihrer Verwendung legten wir die Transplantate, mit der Innenseite nach unten, auf ein mit physiologischer Kochsalzlösung getränktes Filterpapier in einer eisgekühlten Petrischale.

Zur Betäubung der Empfängertiere verwendeten wir zehnprozentiges Nembutal^{R 1)} in physiologischer Kochsalzlösung. Zur Berechnung der Dosis diente uns eine durch eigene Erfahrung gewonnene Faustformel, die auch bei länger vorbehandelten und geschwächten Tieren Narkosen ohne größere Ausfälle ermöglichte. Für jedes Gramm Körpergewicht erhielt eine Maus 0.01 ml Nembutal, dazu, unabhängig vom Gewicht, jeweils 0.08 ml, intraperitoneal appliziert. Einem Tier von 20 Gramm Körpergewicht spritzten wir somit 0.28 ml.

Die narkotisierten Tiere wurden an den Pfoten gefesselt und mit Gummiringen unter leichtem Zug auf ein Operationsbrett gespannt. Der Rücken und seitliche Thorax wurden glatt rasiert und mit Alkohol desinfiziert.

In die Haut der dorsolateralen Thoraxregion schnitten wir mit feinen gebogenen Scheren beidseits die Transplantatbeteten. Bei der Entfernung der Epidermis versuchten wir nach Möglichkeit eine Verletzung des Platysmas und größerer Hautgefäße zu verhindern. Trotzdem gelegentlich auftretende

1) Natriumsalz der 5-Äthyl-5-(1-methyl-butyl)barbitursäure (Abbot)

Blutungen wurden unter leichtem Druck sorgfältig gestillt, um spätere Unterblutungen der Hauttransplantate zu vermeiden.

In die frischen Wunden streuten wir Nebacetin^{R 1)} - Puder und legten darauf die Hauttransplantate. Links implantierten wir die isogenen Kontrolltransplantate, rechts die homologen, experimentellen.

Die Hautstücke wurden exakt in die ausgeschnittenen Stellen eingelegt und dabei so gedreht, daß die Wuchsrichtungen der Transplantat- und der Empfängerhaare einander entgegengesetzt waren.

Von chirurgischem Verbandsmaterial²⁾ lösten wir die beiden äußeren Schichten aus dünnster durchsichtiger Kunststoffolie von dem dazwischen liegenden Mull ab und schnitten sie in ca. 1.5 x 1.5 cm große Stückchen. Knapp am Rande jedes Transplantats brachten wir kreisförmig eine kleine Menge Vaseline alba auf und legten darauf eines der perforierten, luftdurchlässigen Folienstückchen. Auf diese Weise entstand über den Transplantaten eine kleine Kammer, in der sie gegen Verschiebungen bei weiteren Manipulationen gut geschützt waren. Schließlich erhielt jedes Tier einen straffen zirkulären Thoraxverband. Er bestand aus einem ca. zwei cm breiten und 5 cm langen Stück Komresse und einem ebenso breiten, jedoch etwas längeren perforierten Klebestreifen³⁾, welcher über die Komresse geklebt wurde.

Somit erfolgte die Fixation und Einheilung der Transplantate unter dem Druck der Verbände.

1) Neomycin-Bacitracin (Byk-Gulden)

2) Telfa Surgical Dressing

3) First Aid Tape v. Johnson

Am siebten Tag nach der Transplantation wurden die Verbände zum ersten Mal gewechselt. Dabei prüften wir den Sitz der Transplantate, beseitigten überstehende Hautteile und entfernten mit in Kochsalzlösung getränkten Tupfern möglichst weitgehend Blutkrusten und Schorf.

Nach der Untersuchung brachten wir auf die Transplantate Vaseline alba zur Verhinderung von Austrocknung und Verklebungen auf. Um Kratzverletzungen der Transplantate zu verhüten, legten wir den Mäusen nach allen Untersuchungen Verbände, bestehend aus einem Stück Kompresse und Klebstreifen, an.

Außer in Versuch 3.4. wiederholten wir diese Maßnahmen bei allen Tieren täglich bis zur endgültigen Abstoßung der jeweiligen Homotransplantate.

Bei den Untersuchungen achteten wir insbesondere auf folgende, makroskopisch erkennbare Zeichen von Abstoßungsreaktionen:

- Rötung
- Schrumpfung
- Konsistenzänderungen
- Nässen und Krustenbildung
- Ablösung oberflächlicher Epithelschichten bei minimalen mechanischen Irritationen
- Schwellung
- Abblassen
- Nekrosen

Als Zeitpunkt der totalen Abstoßung legten wir den Tag fest, an dem zum ersten Mal vom Transplantat nichts mehr zu erkennen war.

Mögliche Fehlerquellen dieser subjektiven Methode sollten durch zwei Maßnahmen weitgehend ausgeschlossen werden:

- Die Transplantate wurden von drei Untersuchern unabhängig beurteilt
- Die täglich erhobenen Befunde wurden aufgezeichnet.

Die numerierten Mäuse wurden dazu mit Punktzahlen (0, 25, 50, 75, 100), jeweils für Homo- und Isotransplantat, bewertet. Den vergebenen Punkten entsprachen innerhalb des Teams vereinbarte, qualitativ und quantitativ definierte Veränderungen der Transplantate.

Bei den Versuchen 3.1., 3.2., 3.4. narkotisierten wir die Mäuse anlässlich jeder Untersuchung mit Äther in einem Becherglas. Bei den Versuchen 3.3., 3.5. verwendeten wir statt dessen ein einfach konstruiertes und funktionierendes Gestell (Abb.3), wodurch sich die täglichen Narkosen erübrigten. Seine Vorteile lagen in der Zeitersparnis, der Schonung der Tiere sowie der Vermeidung narkosebedingter Ausfälle.



Abbildung 3

2.6. Vitamin-B₆-Status

2.6.1. Vitamin-B₆-Bestimmung

Zur Orientierung über die Vitamin-B₆-Versorgung der Versuchstiere bedienten wir uns einer enzymatischen Bestimmungsmethode. Die erythrozytäre Glutamat - Oxalacetat - Transaminase (EGOT) wird durch Pyridoxal - 5' - Phosphat (PALP) aktiviert. Der Quotient aus der EGOT - Aktivität nach Zugabe von PALP und der ursprünglichen Basisaktivität führt zum Aktivierungskoeffizienten α_{EGOT} . Dieser ist ein direkter Index für die intrazelluläre, erythrozytäre PALP - Aktivität. Koeffizienten $\alpha_{\text{EGOT}} \geq 1.70$ beweisen einen biochemischen Vitamin-B₆-Mangel.

2.6.2. EGOT-Bestimmung

Die aus gewaschenen Erythrozyten durch Saponinhämolyse freigesetzte EGOT setzt die Reaktion von Aspartat und α -Ketoglutarat zu Oxalacetat und Glutamat in Gang. Das neuentstandene Oxalacetat wird durch zugefügte Malatdehydrogenase zu Malat reduziert. Bei dieser Reaktion wird Nicotinamidadenindinucleotid (NADH^+) verbraucht. Der Verbrauch von NADH^+ , ermittelt durch die Extinktionsabnahme bei 334 nm, entspricht dem neugebildeten Oxalacetat und spiegelt somit den Grad der EGOT-Aktivität wider.

2.6.3. Entnahme und Verarbeitung des Mäusebluts

Den zur Vitamin-B₆-Bestimmung vorgesehenen Tieren applizierten wir intraperitoneal Nembutal^R, ausreichend für eine

tiefe Narkose. In den eröffneten Thorax gaben wir einen Tropfen Liquemin^{R 1)}. Dann durchtrennten wir das zum Herzen ziehende Gefäßband und saugten das austretende Blut mit einer Tuberkulinspritze vorsichtig aus dem Thorax. Von jedem Tier gewannen wir so zwischen 0.6 und 1.1 ml Blut.

Das Blut von jeweils drei Mäusen wurde in graduierten Zentrifugengläsern zu einer Probe vermischt und mit physiologischer Kochsalzlösung auf 8 - 9 ml verdünnt. Nach mehrmaligem langsamen Kippen wurde die Probe bei 2000 UpM 10 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde unter Verwendung einer Pasteurpipette mittels Vacuum abgesaugt.

Beim dritten derartigen Waschvorgang zentrifugierten wir die Proben 15 Minuten. Zusammen mit der Waschflüssigkeit saugten wir dann die oberste Schicht des Sediments, bestehend aus Leukozyten (buffy layer) ab. Dem verbleibenden Erythrozytensediment fügten wir soviel physiologische Kochsalzlösung zu, daß der Hämatokrit der Suspension ca. 50 betrug. Dieser wurde anschließend genau bestimmt. 0.5 ml dieser Erythrozytenaufschwemmung pipettierten wir zu 9.5 ml einer 0.025 %igen Saponinlösung. Dieses Gemisch ließen wir bei Raumtemperatur 15 Minuten stehen. Bis zur weiteren Verarbeitung nach dem unter 2.6.1. und 2.6.2. beschriebenen Prinzip wurde das Hämolysat tiefgekühlt.

1) Heparin (Roche)

2.7. Milzzellsuspension

Die Milzentnahme erfolgte unmittelbar nach Tötung der jeweiligen Maus. Das frisch entnommene Organ zerkleinerten wir mit einer Schere und legten es in eisgekühlte Hanks Lösung. In diesem Medium verarbeiteten wir die Milzen sorgfältig in gläsernen Gewebshomogenisatoren ¹⁾. Das Homogenisat zentrifugierten wir nur wenige Sekunden lang mit 500 UpM und verwarfen das Sediment, bestehend aus grobflockigen Milzstroma, Kapsel- und Gefäßbestandteilen. Dann wurde die Milzzellsuspension zweimal in eisgekühlter Hanks Lösung gewaschen (jeweils 5 Minuten bei 1000 - 1200 UpM) und der Überstand verworfen. Nach dem letzten Waschvorgang wurde das Milzzellsediment wieder in Hanks Lösung suspendiert. Um eine möglichst homogene und von Zellaggregaten freie Lösung zu erhalten, pipettierten wir mit einer Pasteurpipette innerhalb der Suspension langsam hin und her. Damit sollte eine genaue Bestimmung der Milzzellkonzentration ermöglicht werden. Die Auszählung der Zellen erfolgte im Dunkelfeld unter Verwendung eines Neubauer Hämozytometers. Dieses beschickten wir aus einer Erythrozytenpipette mit einem Gemisch aus Milzzellsuspension und dreiprozentiger Essigsäure.

Die Konzentration der Milzzellen in der Suspension betrug 150 Millionen/ml.

1) Elvejen Potter Grinder

2.8. Statistische Auswertung

Sie erfolgte nach einer von Litchfield (39) angegebenen graphischen Methode.

Nach Beendigung der Versuche stellten wir jeweils fest, wieviele Tiere bis zu den einzelnen Kontrolltagen insgesamt ihre Transplantate vollkommen abgestoßen hatten. Diese Anzahl, ausgedrückt in Prozent aller in die Endwertung gelangten Tiere, wobei alle technischen Ausfälle vor kompletter Abstoßung nicht berücksichtigt wurden, wurde nach Auf- bzw. Abrundung auf Wahrscheinlichkeitspapier ¹⁾ gegen die Zeit aufgetragen. Unter vornehmlicher Berücksichtigung der Werte zwischen zehn und 90 Prozent legten wir durch die Punkte eine gemittelte Gerade. Ihr entnahmen wir die Zeitpunkte, zu denen 16, 50 und 84 Prozent der Tiere abgestoßen hatten (Effective Times ET_{16} , ET_{50} und ET_{84}). ET_{50} entsprach der mittleren Abstoßungszeit.

Nach der Formel $S = 1/2 (ET_{84}/ET_{50} + ET_{50}/ET_{16})$ errechneten wir einen Wert, der bei dieser Methode der Standardabweichung entspricht.

Unter Verwendung von S, N (Anzahl der bewerteten Tiere) und N_1 ($2N - 1$) entnahmen wir mehreren, von Litchfield angegebenen Nomographen die Faktoren f_S und f_{ET50} . Sie dienten zur Ermittlung der Vertrauensgrenzen von S und ET_{50} mit einer Wahrscheinlichkeit von 19/20 ($p = 0.05$)

$$\begin{array}{lll} S \times f_S & ET_{50} \times f_{ET50} & \text{obere Vertrauensgrenze} \\ S : f_S & ET_{50} : f_{ET50} & \text{untere Vertrauensgrenze} \end{array}$$

Die folgende Berechnung diente der Feststellung, ob unsere therapeutischen Maßnahmen signifikanten Einfluß auf die mittlere Abstoßungszeit (ET_{50}) hatten.

1) Schleicher, Schüll 667 451 Nr. 297 1/2

Sollten z.B. die Werte $ET_{50'}$ und $ET_{50''}$ auf signifikante Unterschiedlichkeit hin überprüft werden, so galt:

$RR = ET_{50'}/ET_{50''}$, wobei $ET_{50'}$ der größere Wert sein mußte.

Einem Nomographen entnahmen wir unter Verwendung von $f_{ET50'}$ und $f_{ET50''}$ den Wert f_{RR} .

Nun galt:

$RR > f_{RR}$ Die beiden Werte $ET_{50'}$ und $ET_{50''}$ unterscheiden sich signifikant (19/20 Wahrscheinlichkeit)

$RR < f_{RR}$ Kein signifikanter Unterschied zwischen $ET_{50'}$ und $ET_{50''}$

Ermittlung der oberen und unteren Vertrauensgrenzen von RR:

$RR \times f_{RR}$ obere Vertrauensgrenze

$RR : f_{RR}$ untere Vertrauensgrenze

3. Experimente

3.1. Versuch I

3.1.1. Fragestellung

Diesen Versuch führten wir durch, um den Einfluß von Hunger und starkem Gewichtsverlust der Empfängertiere auf die Überlebenszeit von Homotransplantaten zu untersuchen. Diese Untersuchung erschien uns deshalb notwendig, weil experimentelle Maßnahmen an Mäusen, die zu einem Vitamin-B₆-Mangel führen, immer mit einem von der Behandlungsdauer abhängigen Gewichtsverlust einhergehen (2.27.).

3.1.2. Präoperative Behandlung und Transplantation

50 ausgewachsene, weibliche Mäuse des Stammes C57B1/6J wurden in Einzelkäfige gesetzt. Die Tiere der Gruppe I (n = 25) wurden täglich gewogen. Entsprechend ihrem jeweiligen Gewicht erhielten sie bei der täglichen Fütterung jeweils nur so viel angereichertes Standardfutter, daß sich ihr durchschnittliches Körpergewicht während der zwölf Tage vor dem Transplantationstermin stets zwischen 70 und 78% des Ausgangswertes bewegte. (Abbildung 4)

Um während der kalorisch defizitären Ernährung bei täglichen Futtermengen zwischen null und vier Gramm einem Vitamin-B₆-Mangel vorzubeugen, setzten wir dem Trinkwasser Hexobion^{R 6 1)} zu. Die gewählte Trinkwasserkonzentration garantierte eine wöchentliche Aufnahme von 12 µg/Maus Vitamin B₆, zusätzlich zu der im Futter enthaltenen Vitaminmenge.

Die Tiere der Gruppe II(n = 25) dienten als Kontrollen. Sie erhielten Standardfutter ad libitum und Wasser ohne Zusatz zu trinken. Wägungen erfolgten bei dieser Gruppe in

1) Pyridoxinhydrochlorid (Merck)

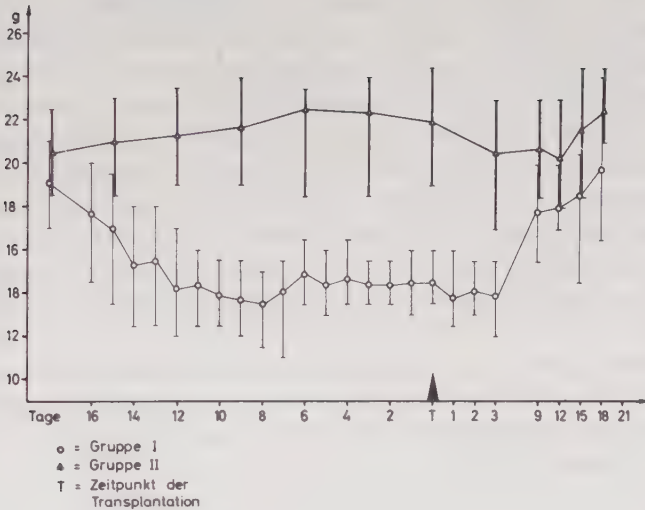


Abbildung 4

dreitägigen Abständen.

Spender der Allotransplantate waren ausgewachsene, weibliche Mäuse des Stammes 129 J. Zwischen den Stämmen 129 J und C57Bl/6J besteht eine schwache, nicht H-2-gebundene Histoinkompatibilität.

3.1.3. Postoperative Behandlung und Verlauf

Bis zum fünften postoperativen Tag wurde bei Gruppe I die präoperative Behandlung fortgesetzt. Dann beendeten wir die Vitamin-B₆-Substitution und gaben den Mäusen ad libitum zu fressen.

Die Behandlung der Gruppe II wurde postoperativ unverändert beibehalten.

Allo- und Isotransplantate waren am 7. Tag nach der Transplantation einwandfrei eingeeilt, vital gefärbt und zeigten makroskopisch keine nennenswerten Unterschiede. Neben weniger konstanten Symptomen wie Schwellung und Rötung boten die Homotransplantate beider Gruppen im weiteren Verlauf vorwiegend Anzeichen einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber mechanischen Reizen. So lösten sich zuerst die Haare, später auch zunehmend mehr Epithelschichten der Transplantate bereits bei leichtem Schaben mit einer Pinzette ab. Unter zunehmender Schrumpfung und Exsudation wurden die homologen Transplantate abgestoßen und schließlich durch Schorf und Narbengewebe ersetzt.

Demgegenüber erwiesen sich die Isotransplantate mechanischen Irritationen gegenüber als unempfindlich, boten keine Entzündungszeichen und zeigten gegen Versuchsende kräftigen Haarwuchs bei unverminderter Größe.

Somit waren nicht technische Fehler, sondern Abstoßungsvorgänge verantwortlich für die Veränderungen an den Homotransplantaten.

3.1.4. Ergebnisse

Nach Eliminierung der Mäuse mit technisch schlechten Transplantaten und narkosebedingten Ausfällen verblieben noch 16 Tiere aus Gruppe I und 17 der Gruppe II für die endgültige Bewertung.

$$\begin{array}{l} \text{Gruppe I} \quad \frac{ET_{50}}{S} = \frac{17.3 (16.0 - 18.7)}{1.18 (1.11 - 1.25)} \quad (\text{Tage}) \end{array}$$

$$\begin{array}{l} \text{Gruppe II} \quad \frac{ET_{50}}{S} = \frac{13.7 (12.2 - 15.4)}{1.27 (1.18 - 1.37)} \quad (\text{Tage}) \end{array}$$

Die mittleren Abstoßungszeiten der Gruppen I und II unterscheiden sich signifikant (s.3.1.5.).

3.1.5. Statistische Auswertung

Gruppe I

Tag	Abstoßungen	
	abs.°	%
15	2	13
16	6	38
17	8	50
18	12	75
19	12	75
20	13	81
22	14	88
23	15	94
30	16	100

$$ET_{84} = 20.4$$

$$ET_{50} = 17.3$$

$$ET_{16} = 14.8$$

$$N = 16$$

$$N_1 = 31$$

$$f_{ET50} = 1.08$$

$$f_S = 1.06$$

$$S \times f_S = 1.25$$

$$S : f_S = 1.11$$

$$ET_{50} \times f_{ET50} = 18.7$$

$$ET_{50} : f_{ET50} = 16.0$$

$$S = 1.18 \quad (1.11 - 1.25)$$

$$ET_{50} = 17.3 \quad (16.0 - 18.7)$$

$$S = 1.18$$

Gruppe II

Tag Abstoßungen

	abs.	%
11	4	24
12	6	35
13	6	35
14	9	53
15	11	59
16	13	77
17	17	100

$$ET_{84} = 17.3$$

$$ET_{50} = 13.7 \quad S = 1.27$$

$$ET_{16} = 10.7$$

$$N = 17$$

$$N_1 = 33$$

$$f_{ET50} = 1.12$$

$$f_S = 1.08$$

$$S \times f_S = 1.37$$

$$S : f_S = 1.18$$

$$ET_{50} \times f_{ET50} = 15.4$$

$$ET_{50} : f_{ET50} = 12.2$$

$$S = 1.27(1.18 - 1.37)$$

$$ET_{50} = 13.7(12.2 - 15.4)$$

Signifikanz:

$$RR = ET_{50'} : ET_{50''}$$

$$= 17.3 : 13.7$$

$$RR = \frac{1.26}{1.12}$$

$$f_{RR} = 1.12$$

$$RR \times f_{RR} = 1.41$$

$$RR : f_{RR} = 1.13$$

$$RR = \frac{1.26}{(1.13 - 1.41)}$$

$$f_{RR} = 1.12$$

$$RR > f_{RR}$$

3.2. Versuch II

3.2.1. Fragestellung

Es sollte nachgewiesen werden, ob ein rein alimentär induzierter Vitamin-B₆-Mangel der Empfängertiere die Überlebensdauer von homologen Hauttransplantaten beeinflusst.

3.2.2. Präoperative Behandlung und Transplantation

56 ausgewachsene Mäuse des Stamms C57Bl/6J (weiblich) wurden in Einzelkäfige auf grobmaschige Drahtgitter gesetzt. Diese Maßnahme sollte verhindern, daß die Mäuse, die zur Eigen- und Fremdkoprophagie neigen, mit den Fäces unkontrollierbare Vitamin-B₆-Mengen aufnehmen.

Die Tiere der Gruppe I (n = 28) erhielten pyridoxinfreies Futter ad libitum. Den Mäusen der Gruppe II (n = 28), die als Kontrollen dienten, verabreichten wir unter ansonst gleichen Bedingungen Hexobion^{R 1)} im Trinkwasser, (ca. 20 µg/Maus/Woche) und, gelöst in isotoner Kochsalzlösung, intraperitoneal (2 x 15 µg/Maus/Woche).

Die Tiere beider Gruppen wurden wöchentlich einmal gewogen. Die Abweichung der Durchschnittsgewichte betrug maximal 10 % (Abbildung 5).

Nach siebenwöchiger Behandlung entsprechend obigem Schema transplantierten wir beiden Gruppen Haut von ausgewachsenen weiblichen Mäusen des Stamms 129J.

3.2.3. Postoperative Behandlung und Verlauf

Bis zum fünften postoperativen Tag setzten wir die präoperative Behandlung fort. Dann beendeten wir die Substitution von Vitamin B₆ bei Gruppe II und verabreichten allen Tieren

1) Pyridoxinhydrochlorid (Merck)

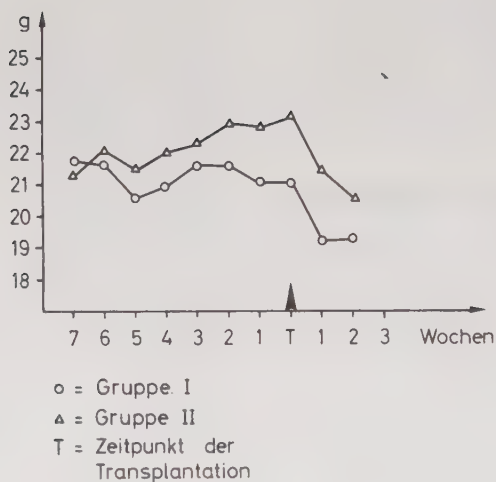


Abbildung 5

das angereicherte Standardfutter.

Die meisten Transplantate waren zum Zeitpunkt der ersten Inspektionen gut eingeeilt. Die Abstoßung erfolgte unter den bei 3.1.3. als typisch beschriebenen Veränderungen.

3.2.4. Vitamin-B₆-Status

Drei Tage vor dem Transplantationstermin entbluteten wir drei Tiere der Gruppe I und zwei der Gruppe II. Die für Gruppe I bestimmten Aktivierungskoeffizienten α_{EGOT} von 2.24-2.47-3.16 zeigten einen signifikanten Vitamin-B₆-Mangel an. Die α_{EGOT} -Werte der Gruppe II lagen mit 1.59-1.73 im Grenzbereich einer ausreichenden Pyridoxolverversorgung.

3.2.5. Ergebnisse

Nach dem Ausfall der zur Pyridoxinbestimmung vorgesehenen Tiere sowie technisch bedingten Verlusten verblieben aus beiden Gruppen je 19 Mäuse für die endgültige Bewertung.

$$\text{Gruppe I} \quad \underline{\text{ET}_{50} = 17.9 \text{ (} 16.9 - 19.0 \text{)}} \quad (\text{Tage})$$

$$S = 1.15 \text{ (} 1.10 - 1.20 \text{)}$$

$$\text{Gruppe II} \quad \underline{\text{ET}_{50} = 17.4 \text{ (} 16.7 - 18.1 \text{)}} \quad (\text{Tage})$$

$$S = 1.09 \text{ (} 1.06 - 1.12 \text{)}$$

Die mittleren Abstoßungszeiten der Gruppen I und II unterscheiden sich nicht signifikant (s. 3.2.6.).

3.2.6. Statistische Auswertung

Gruppe I			ET_{84}	= 20.5	
Tag	Abstoßungen		ET_{50}	= 17.9	$S = 1.15$
	abs.	%	ET_{16}	= 15.6	
15	2	11	N	= 19	
16	6	32	N_1	= 37	
17	7	37	f_S	= 1.05	
18	10	53	$f_{\text{ET}_{50}}$	= 1.06	
19	13	68	$S \times f_S$	= 1.20	
20	15	79	$S : f_S$	= 1.10	
21	16	84	$\text{ET}_{50} \times f_{\text{ET}_{50}}$	= 19.0	
22	18	95	$\text{ET}_{50} : f_{\text{ET}_{50}}$	= 16.9	
23	19	100	$\underline{S = 1.15 \text{ (} 1.10 - 1.20 \text{)}}$		
			$\underline{\text{ET}_{50} = 17.9 \text{ (} 16.9 - 19.0 \text{)}}$		

Gruppe II

Tag	Abstoßungen	
	abs.	%
16	3	16
17	6	32
18	12	63
19	17	89
20	18	95
21	18	95
22	19	100

$$ET_{84} = 19.0$$

$$ET_{50} = 17.4 \quad S = 1.09$$

$$ET_{16} = 16.0$$

$$N = 19$$

$$N_1 = 37$$

$$f_S = 1.03$$

$$f_{ET50} = 1.04$$

$$S \times f_S = 1.12$$

$$S : f_S = 1.06$$

$$ET_{50} \times f_{ET50} = 18.1$$

$$ET_{50} : f_{ET50} = 16.7$$

$$S = 1.09 \quad (1.06 - 1.12)$$

$$ET_{50} = 17.4 \quad (16.7 - 18.1)$$

Signifikanz:

$$RR = ET_{50}' : ET_{50}''$$

$$= 17.9 : 17.4$$

$$RR = 1.02$$

$$f_{RR} = 1.08$$

$$RR \times f_{RR} = 1.10$$

$$RR : f_{RR} = 0.94$$

$$RR = 1.02 \quad (0.94 - 1.10)$$

$$f_{RR} = 1.08$$

$$RR < f_{RR}$$

3.3. Versuch III

3.3.1. Fragestellung

In diesem Versuch sollte geprüft werden, ob sich die mittlere Abstoßungszeit von Hauthomotransplantaten durch einen stärkeren, alimentären Pyridoxolmangel, als wir in Versuch 3.2. induzierten, signifikant verlängern läßt.

3.3.2. Präoperative Behandlung und Transplantation

Analog dem Versuch 3.2. setzten wir zwei Gruppen von erwachsenen weiblichen Mäusen des Stamms C57Bl/6J in Einzelkäfige. Gruppe I (n = 38) erhielt Pyridoxolmangelfutter in beliebiger Menge, Gruppe II (n = 27) zur Vitaminsubstitution zum gleichen Futter jedoch Hexobion^{R 1)} im Trinkwasser. Die Dosierung wurde so gewählt, daß jede Maus in der Woche durchschnittlich 0.1 mg Vitamin-B₆ oral aufnahm. Angesichts dieser hohen Vitamindosen verzichteten wir auf eine zusätzliche parenterale Vitaminzufuhr.

Unter dieser Therapie wichen die Gewichtskurven der beiden Gruppen ab der fünften Woche nach Versuchsbeginn erheblich voneinander ab (Abbildung 6). Um die Tiere der Gruppe I nicht in zu schlechtem Zustand operieren zu müssen, transplantierten wir abweichend vom Vorgehen in Versuch 3.2. bereits nach der sechsten Behandlungswoche.

Transplantation: siehe Versuch 3.2.

3.3.3. Postoperative Behandlung und Verlauf

Abweichend von Versuch 3.2. setzten wir die Mäuse diesmal ab dem fünften postoperativen Tag in Fünfergruppen in kleine

1) Pyridoxinhydrochlorid (Merck)

Sammelkäfige. Die Tiere beider Gruppen wurden bis zum fünften postoperativen Tag gemäß dem präoperativ angewandten Schema behandelt und erhielten dann alle das angereicherte Standardfutter.

Verlauf: siehe Versuch 3.2.

3.3.4. Vitamin-B₆-Status

Zwei Tage vor dem vorgesehenen Transplantationstermin entbluteten wir elf Tiere der Gruppe I und sieben der Gruppe II und arbeiteten die Blutproben bis zum Hämolysat auf.

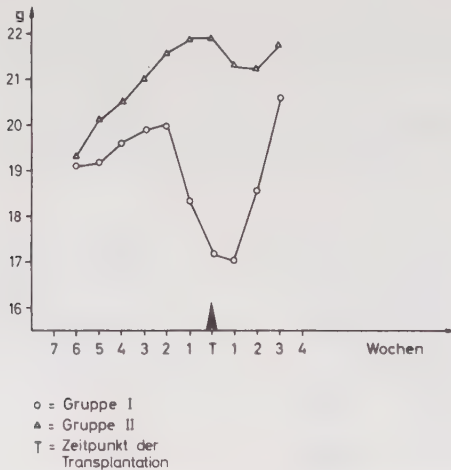


Abbildung 6

Die Tiere der Gruppe I wiesen mit Werten von α_{EGOT} 4.75-5.56-7.58 eine hochgradige Vitamin-B₆-Verarmung auf, wohingegen die Mäuse der Gruppe II bei Aktivierungskoeffizienten von 1.03-1.05 ausreichend mit Vitamin B₆ versorgt waren.

3.3.5. Ergebnisse

In Gruppe I waren 22, in Gruppe II 18 Tiere bei Versuchsende bewertbar.

$$\text{Gruppe I} \quad \frac{ET}{50} = 19.0 \quad (\quad 17.9 \quad - \quad 20.2 \quad) \quad (\text{Tage})$$

$$S \quad = \quad 1.15 \quad (\quad 1.10 \quad - \quad 1.20 \quad)$$

$$\text{Gruppe II} \quad \frac{ET}{50} = 16.0 \quad (\quad 14.4 \quad - \quad 17.8 \quad) \quad (\text{Tage})$$

$$S \quad = \quad 1.26 \quad (\quad 1.17 \quad - \quad 1.36 \quad)$$

Die mittleren Abstoßungszeiten der Gruppen I und II unterscheiden sich signifikant.

3.3.6. Statistische Auswertung

Gruppe I

Tag Abstoßungen

abs. %

15 1 5

16 2 9

17 7 32

18 8 36

19 11 50

20 14 63

21 19 87

22 20 91

24 21 96

25 22 100

$$\begin{aligned}
 ET_{84} &= 21.8 \\
 ET_{50} &= 19.0 \\
 ET_{16} &= 16.5 \quad S = 1.15 \\
 N &= 22 \\
 N_1 &= 43 \\
 f_{ET50} &= 1.06 \\
 f_S &= 1.04 \\
 ET_{50} \times f_{ET50} &= 20.2 \\
 ET_{50} : f_{ET50} &= 17.9 \\
 S \times f_S &= 1.20 \\
 S : f_S &= 1.10 \\
 \underline{ET_{50} = 19.0 \quad (\quad 17.9 \quad - \quad 20.2 \quad)} \\
 \underline{S = 1.15 \quad (\quad 1.10 \quad - \quad 1.20 \quad)}
 \end{aligned}$$

Gruppe II

Tag Abstoßungen

	abs.	%
15	2	11
16	7	39
17	11	61
18	11	61
19	13	72
20	14	78
21	14	78
23	16	89
24	18	100

$$ET_{84} = 20.0$$

$$ET_{50} = 16.0$$

$$ET_{16} = 12.6 \quad S = 1.26$$

$$N = 18$$

$$N_1 = 35$$

$$f_{ET50} = 1.11$$

$$f_S = 1.08$$

$$ET_{50} \times f_{ET50} = 17.8$$

$$ET_{50} : f_{ET50} = 14.4$$

$$S \times f_S = 1.36$$

$$S : f_S = 1.17$$

$$\underline{ET_{50} = 16.0 \quad (14.4 - 17.8)}$$

$$\underline{S = 1.26 \quad (1.17 - 1.36)}$$

Signifikanz:

$$RR = ET_{50}' : ET_{50}''$$

$$= 19.0 : 16.0$$

$$\underline{RR = 1.12}$$

$$\underline{f_{RR} = 1.11}$$

$$RR \times f_{RR} = 1.32$$

$$RR : f_{RR} = 1.07$$

$$\underline{RR = 1.19 \quad (1.07 - 1.32)}$$

$$\underline{f_{RR} = 1.11}$$

$$RR > f_{RR}$$

3.4. Versuch IV

3.4.1. Fragestellung

Hier vollzogen wir ein von TRAKATELLIS und AXELROD (5.55) angegebenes Experiment nach. Sie hatten beobachtet, daß weibliche C57Bl/6J - Mäuse Hauttransplantate von männlichen Tieren desselben Stamms, die sie gewöhnlich wie Homotransplantate abstoßen, unter gewissen Bedingungen tolerieren. Wurden nämlich den Empfängertieren während eines mit 4'-Desoxypyridoxol induzierten Vitamin-B₆- Mangels einmalig 50 Millionen Milzzellen der Hautspender intraperitoneal injiziert, so konnte in allen Fällen dauerhafte Toleranz beobachtet werden. Die Kontrolltiere, denen ohne weitere Behandlung Milzzellen injiziert worden waren, erwiesen sich nur in 46 % der Fälle als tolerant. Temporärer Vitamin-B₆-Mangel kombiniert mit Milzzellinjektionen erzielte auch bei niedrigeren Milzzelldosierungen (zehn bzw. 25 Millionen) Toleranzquoten von 55 und 74 Prozent (55).

3.4.2. Präoperative Behandlung und Transplantation

66 weibliche, ausgewachsene Mäuse vom Stamm C57Bl/6J wurden in drei Gruppen zu je 22 Tieren auf Sammelkäfige verteilt. Hier und in Versuch 3.5. war eine Isolierung der Mäuse in Einzelkäfigen nicht notwendig. 4'-Desoxypyridoxol ist ein so starker Vitamin-B₆-Antagonist, daß geringen Vitaminmengen, wie sie bei Koprophagie aufgenommen werden, keine nennenswerte Bedeutung zukommt.

Während der ersten 14 Tage, die der Eingewöhnung dienten, erhielten alle Tiere das angereicherte Standardfutter. Dann wurde Gruppe I vom 15. bis zum 35. Tag mit dem vitaminfreien Futter ernährt. Außerdem spritzten wir diesen Tieren während dieser Zeit täglich 100 µg 4'-Desoxypyridoxol/100 g Körpergewicht und am 28. Tag 50 Millionen Milzzellen der Haut-

spender intraperitoneal. Bis zur Transplantation fütterten wir Gruppe I ab dem 35. Tag mit Standardfutter.

Die Gruppen II und III wurden von Beginn des Versuchs bis zur Transplantation mit Standardfutter ernährt. Während die Tiere der Gruppe III unbehandelt blieben, applizierten wir denen der Gruppe II am 28. Tag, gleichzeitig mit Gruppe I, 50 Millionen Milzzellen intraperitoneal. Sämtliche Tiere wurden einmal wöchentlich gewogen.

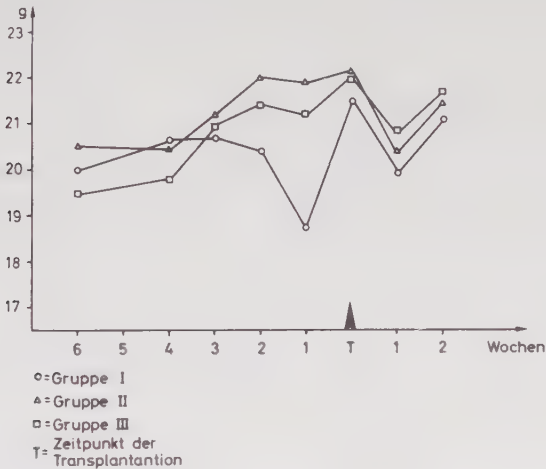


Abbildung 7

Nach Angleichung der Durchschnittsgewichte aller drei Gruppen (Abbildung 7) transplantierten wir am 42. Tag den weiblichen Empfängertieren Haut von unbehandelten männlichen Tieren desselben Stamms. In diesem System besteht eine ge-

schlechtsgebundene Histoinkompatibilität, auch als Eichwald - Siltmer Effekt bezeichnet (55). Es handelt sich hierbei um eine schwache Unverträglichkeit, die jedoch zur Abstoßung männlicher Hauttransplantate ausreicht (16, 17, 18, 29, 30).

3.4.3. Postoperative Behandlung und Verlauf

Sämtliche Tiere wurden nach der Transplantation ohne weitere Behandlung mit Standardfutter ernährt. Die makroskopisch erkennbaren Veränderungen der gut eingewachsenen und vital erscheinenden Homotransplantate unterschieden sich von den bei allen anderen Versuchen erhobenen Befunden grundsätzlich. Standen dort rasch auftretende Schäden der Epitheloberfläche im Vordergrund, so beobachteten wir hier als erste Abstoßungszeichen flächenmäßige Verkleinerungen der Transplantate, meistens begleitet von konstanter Konsistenzzunahme. Die stetige Umwandlung der Homotransplantate, von denen in Gruppe I nach acht Wochen 30 % Haarwuchs aufwiesen, in weißlich schimmerndes, konsistentes Narbengewebe mit atrophischer Oberfläche erstreckte sich über mehr als 20 Wochen. Dementsprechend führten wir die Kontrollen in wöchentlichen Abständen durch. Aufgrund der langsamen Abstoßungsreaktion und der großen Kontrollabstände ließen sich die jeweiligen Zeitpunkte der totalen Abstoßung nur annähernd festlegen. Die isogenen Kontrolltransplantate zeigten bald kräftigen Haarwuchs und während der gesamten Beobachtungszeit keinerlei Unverträglichkeitsanzeichen.

3.4.4. Vitamin-B₆-Status

Da es uns aus technischen Gründen nicht möglich war, bei den Tieren der Gruppe I zum Zeitpunkt der Milzzellinjektion eine Vitamin-B₆-Bestimmung durchzuführen, der Nachweis eines

Vitamin-B₆-Mangels aber unerläßlich war, unternahmen wir folgenden Zusatzversuch:

15 männliche Mäuse C57Bl/6J wurden analog der Gruppe I drei Wochen lang mit pyridoxinfreiem Futter ad libitum und täglichen intraperitonealen Injektionen von 4"-Desoxypyridoxol (100 µg/100 g Körpergewicht) behandelt. Dabei verloren sie 9 % ihres Ausgangsgewichts.

Eine gleichzeitig eingesetzte Kontrollgruppe (n = 15) nahm in der gleichen Zeit unter angereichertem Standardfutter 5 % an Gewicht zu.

Nach drei Wochen wurden alle Tiere getötet, ihr Blut nach der unter 2.6. beschriebenen Methode verarbeitet und auf seinen Pyridoxingehalt hin untersucht.

Ergebnis: Bei den analog der Gruppe I behandelten Tiere ließ sich ein ausgeprägter Vitamin-B₆-Mangel nachweisen. Die Aktivierungskoeffizienten α_{EGOT} lagen zwischen 2.47 und 2.57. Bei den Kontrolltieren deuteten α_{EGOT} - Werte von 1.27 bis 1.51 auf einen ungestörten Vitamin-B₆-Haushalt hin.

Wir können deshalb mit hinreichender Sicherheit annehmen, daß die Tiere der Gruppe I zum Zeitpunkt der Aufnahme und Auseinandersetzung mit den "männlichen" Milzzellen ebenfalls einen deutlichen Vitamin-B₆-Mangel aufwiesen.

3.4.5. Ergebnisse

Die Festlegung von Abstoßungsterminen war aus oben erwähnten Gründen nicht mit der gleichen Sicherheit wie in den übrigen Versuchen möglich. Deshalb verzichteten wir auch auf eine statistische Auswertung und beschränkten uns auf eine graphische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Abstoßungen (Abbildung 8).

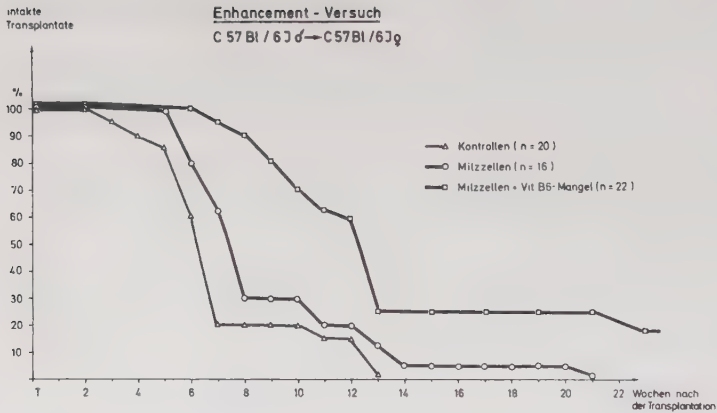


Abbildung 8

Als wichtigstes Resultat bleibt anzuführen, daß vier Mäuse der Gruppe I (18 %) ihre Homotransplantate noch nach einem Jahr Beobachtungsdauer bei unverminderter Größe und dichtem Haarwuchs tolerierten (Abbildung 9) .

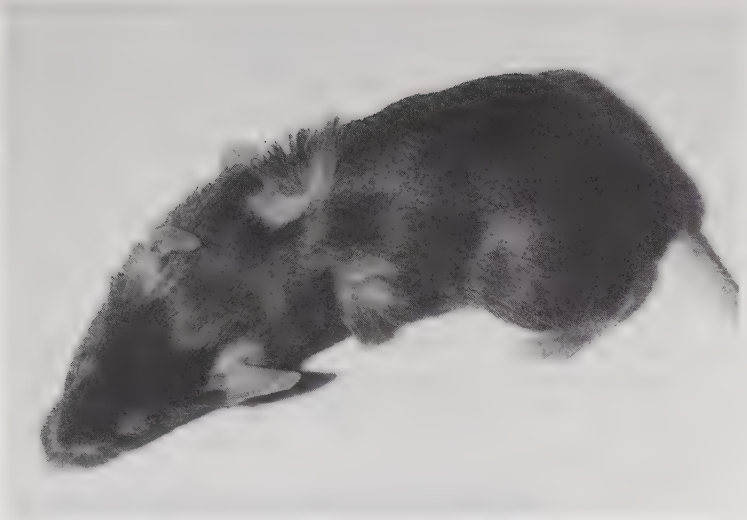


Abbildung 9

3.5. Versuch V

3.5.1. Fragestellung

Bei allen Versuchen hatten wir uns bislang auf eine präoperative und gegebenenfalls fünftägige postoperative Behandlungen beschränkt. Dies geschah in der Annahme, daß die Zeit unmittelbar nach Transplantationen die für immunologische Prozesse entscheidende sei. Störungen des Immunsystems, die während dieses Zeitabschnitts eintraten, wirkten sich deshalb trotz kurzer Dauer bereits signifikant auf die mittleren Abstoßungszeiten aus. Das folgende Experiment sollte uns die Frage beantworten, ob zwischen der Dauer eines postoperativen Vitamin-B₆-Mangels und den Abstoßungszeiten ein Zusammenhang besteht.

3.5.2. Präoperative Behandlung und Transplantation

63 erwachsene weibliche Mäuse vom Stamm C57Bl/6J teilten wir in drei gleich große Gruppen und setzten sie in Sammelkäfige. Die Tiere der Gruppen I und II fütterten wir während der vier Wochen vor der Transplantation mit Pyridoxinmangelfutter und spritzten ihnen täglich 4'-Desoxypyridoxol (100 μ g/100 g Körpergewicht) intraperitoneal.

Die Mäuse der Gruppe III dienten als Kontrollen und erhielten in der gleichen Zeit Standardfutter.

Nach vierwöchiger Behandlung transplantierten wir den Mäusen Haut von ausgewachsenen, unbehandelten, weiblichen Tieren vom Stamm 129J. Zu diesem Zeitpunkt bestand zwischen den behandelten Mäusen und den Kontrolltieren ein Gewichtsunterschied von ca. 10 % (Abbildung 10).

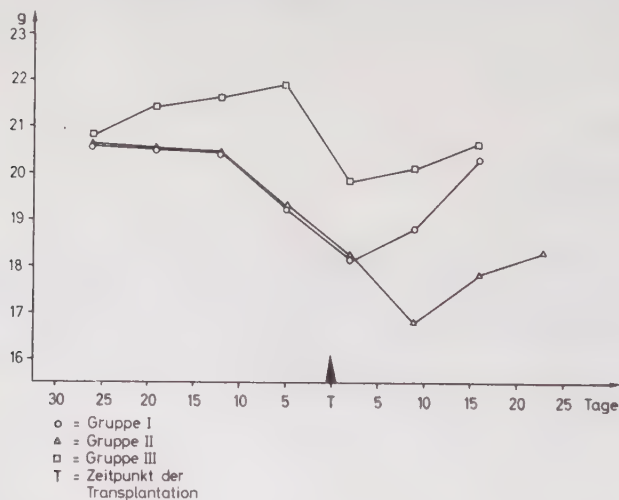


Abbildung 10

3.5.3. Postoperative Behandlung und Verlauf

Die Tiere der Gruppe I wurden postoperativ noch fünf, diejenigen der Gruppe II noch zwölf Tage entsprechend dem präoperativen Therapieschema weiterbehandelt. Gruppe III erhielt weiterhin Standardfutter.

Die postoperative Behandlung führte bei den Tieren der Gruppe II zu einem deutlichen Gewichtsverlust von 18 % des Ausgangsgewichts. Sie zeigten auch weitere ausgeprägte Vitaminmangelerscheinungen: struppiges Fell, Schuppung und Entzündung der Schwanzhaut und Pfoten.

Homo- und Isotransplantate aller drei Gruppen waren nach einer Woche einwandfrei eingewachsen (s. Abbildung 11).



Abbildung 11:
Transplantate eines
Kontrolltieres nach
erfolgter Einheilung:
links erkennt man das
isologe, rechts das
homologe Transplantat.

Die Abstoßung der Homotransplantate in Gruppe I und III nahm den typischen, bereits bei 3.1.3. geschilderten Verlauf.

Gänzlich anders verhielten sich dagegen die Transplantate der Gruppe II. Bereits bei den ersten Verbandswechseln fiel auf, daß sowohl die Fremd- als auch die Kontrolltransplantate bei unverminderter Größe teils Schwellungen aufwiesen, teils atrophisch wirkten und größtenteils blaurot verfärbt waren. Die Epitheloberfläche wies in keinem Fall Defekte auf (s. Abbildung 12).



Abbildung 12
Bei den Tieren der Gruppe II zeigten sowohl Iso- als auch Homotransplantate reversible Entzündungszeichen.

Zwischen dem achten und 19. postoperativen Tag waren fast alle Iso- und Homotransplantate von diesen Veränderungen betroffen. Deshalb konnten sie nicht als Symptome von Abstoßungsvorgängen bewertet werden. Vielmehr handelte es sich um eine durch den protrahierten Pyridoxinmangel induzierte Dermatitis, die sich außer an Pfoten, Schnauze, Schwanzhaut und übrigen Integument auch an den Transplantaten manifestierte. Während sich die Mäuse unter der Ernährung mit Vitamin-B₆-haltigem Futter von den allgemeinen Vitaminmangelerscheinun-

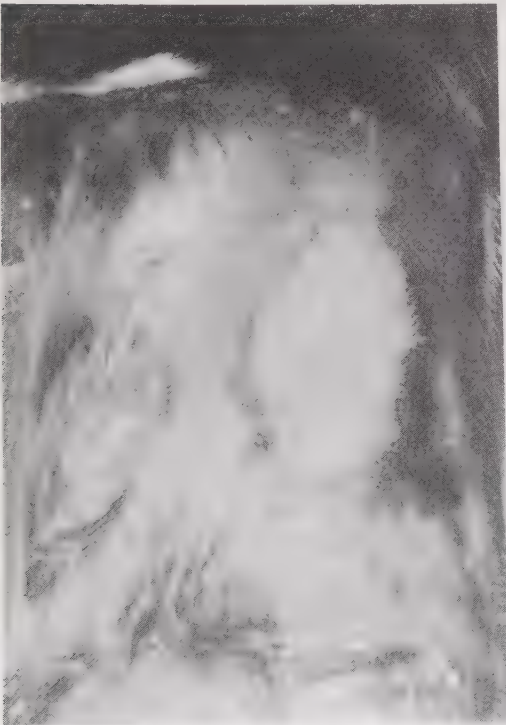


Abbildung 13
Kräftigen Haarwuchs
wiesen zahlreiche
homologe (rechts) und
alle isogenen (links)
Transplantate nach
Abheilung der Derma-
titis auf

gen erhalten, gingen die entzündlichen Veränderungen der Transplantate bis zum 21. postoperativen Tag zurück. Ehe am 23. Tag die ersten diskreten, abstoßungsbedingten Epithelläsionen auftraten, erschienen die Transplantate insgesamt unauffällig. Nicht nur die isogenen,* sondern auch zahlreiche homologe Transplantate wiesen kräftigen Haarwuchs auf (s. Abbildung 13). Die Abstoßung der Homotransplantate vollzog sich zwischen dem 23. und 41. postoperativen Tag unter den typischen, bei 3.1.3. ausführlich geschilderten Symptomen. Als Besonderheit notierten wir deren schon von HERR und COURSIN (31) unter ähnlichen Bedingungen beobachteten protrahierten Ablauf.

3.5.4. Vitamin-B₆-Status

Die Behandlung der Versuchstiere gemäß dem bei 3.4.4. angegebenen Schema erstreckte sich über einen um eine Woche längeren Zeitraum, als in Versuch IV zur Erzielung eines Pyridoxinmangels benötigt wurde. Wir konnten deshalb mit großer Sicherheit annehmen, daß die Mäuse zum Zeitpunkt der Transplantation an einem signifikanten Vitamin-B₆-Mangel litten.

3.5.5. Ergebnisse

Gruppe I	$\frac{ET}{50} = 24.2 \text{ (} 23.7 - 24.7 \text{)}$	(Tage)
(N=17)	S = 1.05 (1.03 - 1.07)	
Gruppe II	$\frac{ET}{50} = 30.8 \text{ (} 29.0 - 32.6 \text{)}$	(Tage)
(N=20)	S = 1.15 (1.11 - 1.20)	
Gruppe III	$\frac{ET}{50} = 15.0 \text{ (} 14.0 - 16.1 \text{)}$	(Tage)
(N=20)	S = 1.16 (1.10 - 1.22)	

Die mittleren Abstoßungszeiten der Gruppen I, II und III unterscheiden sich signifikant.

3.5.6. Statistische Auswertung

Gruppe I

Tag	Abstoßungen	
	abs.	%
22	1	6
23	2	12
24	8	47
25	12	70
26	15	88
27	17	100

$$ET_{84} = 25.5$$

$$ET_{50} = 24.2$$

$$ET_{16} = 23.0 \quad S = 1.05$$

$$N = 17$$

$$N_1 = 33$$

$$f_{ET50} = 1.02$$

$$f_S = 1.02$$

$$ET_{50} \times f_{ET50} = 24.7$$

$$ET_{50} : f_{ET50} = 23.7$$

$$S \times f_S = 1.07$$

$$S : f_S = 1.03$$

$$\underline{ET_{50} = 24.2 \quad (23.7 - 24.7)}$$

$$\underline{S = 1.05 \quad (1.03 - 1.07)}$$

Signifikanz:

Gruppe I - Gruppe II

$$RR = ET_{50'} : ET_{50''}$$

$$= 30.8 : 24.2$$

$$\underline{RR = 1.27}$$

$$\underline{f_{RR} = 1.05}$$

$$RR \times f_{RR} = 1.33$$

$$RR : f_{RR} = 1.21$$

$$\underline{RR = 1.27 \quad (1.21 - 1.33)}$$

$$\underline{f_{RR} = 1.05}$$

$$RR > f_{RR}$$

Gruppe II

Tag	Abstoßungen		ET ₈₄	= 35.0
	abs.	%	ET ₅₀	= 30.8
26	2	10	ET ₁₆	= 26.7 S = 1.15
27	3	15	N	= 20
28	5	25	N ₁	= 39
29	6	30	f _{ET50}	= 1.06
30	8	40	f _S	= 1.04
31	9	45	ET ₅₀ x f _{ET50}	= 32.6
32	13	65	ET ₅₀ : f _{ET50}	= 29.0
33	15	75	S x f _S	= 1.20
34	15	75	S : f _S	= 1.11
35	16	80	<u>ET₅₀ = 30.8 (29.0 - 32.6)</u>	
37	19	95	<u>S = 1.15 (1.11 - 1.20)</u>	
41	20	100		

Signifikanz:

Gruppe II - Gruppe III

$$\begin{aligned} RR &= ET_{50} : ET_{50} \\ &= 30.8 : 15.0 \end{aligned}$$

$$\underline{RR = 2.05}$$

$$\underline{f_{RR} = 1.10}$$

$$RR \times f_{RR} = 2.26$$

$$RR : f_{RR} = 1.86$$

$$\underline{RR = 2.05 (1.86 - 2.26)}$$

$$\underline{f_{RR} = 1.10}$$

$$RR > f_{RR}$$

Gruppe III

Tag	Abstoßungen	
	abs.	%
13	1	5
14	7	35
15	11	55
16	13	65
17	16	80
18	18	90
20	20	100

ET 84	=	17.3	
ET 50	=	15.0	
ET 16	=	12.9	S = 1.16

N	=	20
N ₁	=	39

Signifikanz:
Gruppe I - Gruppe III

f _{ET50}	=	1.07
f _S	=	1.05

$$\begin{aligned} RR &= ET_{50} : ET_{50} \\ &= 24.2 : 15.0 \end{aligned}$$

ET ₅₀ x f _{ET50}	=	16.1
--------------------------------------	---	------

$$RR = 1.61$$

ET ₅₀ : f _{ET50}	=	14.0
--------------------------------------	---	------

$$f_{RR} = 1.05$$

S x f _S	=	1.22
--------------------	---	------

$$RR \times f_{RR} = 1.69$$

S : f _S	=	1.10
--------------------	---	------

$$RR : f_{RR} = 1.53$$

$$ET_{50} = 15.0 \quad (14.0 - 16.1)$$

$$RR = 1.61 \quad (1.53 - 1.69)$$

$$S = 1.16 \quad (1.10 - 1.22)$$

$$f_{RR} = 1.05$$

$$RR > f_{RR}$$

4. Diskussion

4.1. Hunger

Man kann von der Tatsache ausgehen, daß jedem Versuch, bei Tieren auf rein alimentärem Weg oder mittels Vitaminantagonisten einen Pyridoxinmangel zu induzieren, ein Gewichtsverlust folgen wird (2). Dessen Höhe kann innerhalb weiter Grenzen schwanken: 10 % Gewichtsunterschied zur Kontrollgruppe nach siebenwöchiger Vitamin-B₆-freier Ernährung (Versuch 3.2.) und eine 17 %ige Gewichtsabnahme bei Mäusen, die nur neun Tage lang mit Pyridoxinmangelfutter und 4'-Desoxypyridoxol behandelt wurden (27) stehen sich als Extrem gegenüber.

Zahlreiche Forscher sprechen einer Entkräftigung nach längerem Hungerzustand jeglichen hemmenden Einfluß auf das Immunsystem ab: so werde die Bildung humoraler Antikörper nach Applikation zahlreicher Antigene (1.2.28), das Eintreten kutaner Immunreaktionen vom verzögerten Typ (3), und die mittlere Überlebenszeit homologer Transplantate (20) bei verschiedenen Spezies nicht nennenswert verändert.

In Versuch 3.1. zeigten wir, daß, zumindest bei dem von uns verwendeten Mäusestamm C57Bl/6J, eine länger dauernde, starke Reduktion des Körpergewichts nach limitierter Nahrungszufuhr zu einer signifikanten Verlängerung der mittleren Überlebensdauer von Hauthomotransplantaten führt.

Die Ergebnisse der Versuche 3.2. und 3.3. weisen in dieselbe Richtung: Siebenwöchige Fütterung mit pyridoxinfreiem Futter in Versuch 3.2., die nur zu mäßigem Gewichtsverlust (10 %) führte, hatte keine, die sechswöchige gleichartige Behandlung in Versuch 3.3., die zu höherem Gewichtsunterschied zwischen Experimental- und Kontrolltieren (20 %) führte, dagegen signifikante Auswirkungen auf das Verhalten der Homotransplantate. Unsere Ansicht über die Bedeutung des Allgemeinzustandes

für ein funktionsfähiges Immunsystem findet Unterstützung bei AXELROD (2), der bei Ratten nach längerem Hungern ein um 50 Prozent vermindertes Serumkomplement fand und bei FOLLIS (23), der an der gleichen Spezies eine Atrophie von Thymus, Milz und Lymphknoten nachwies. CANNON (11) und BENDITT (7) zeigten, daß chronische Unterernährung bei Tieren die Fähigkeit zur Antikörperproduktion einschränkt. Kinder, die an Proteinmangel litten, zeigten nach EDELMAN in 60 bis 80 Prozent keine Hautreaktionen auf Dinitrofluorbenzol und Candidahauttestantigen. Nach ein- bis zweimonatiger vollwertiger Ernährung wiesen 90 Prozent primär negativ reagierender Kinder intakte Hautreaktionen vom verzögerten Typ gegen die gleichen Testsubstanzen auf (15).

Wie könnte man diese gegensätzlichen Befunde und Ansichten auf einen gemeinsamen Nenner bringen?

Zum einen gilt, daß sich Befunde nicht beliebig von einer Spezies auf die andere übertragen lassen. Zum anderen bedarf es bei Aussagen über Gewichtsverhältnisse einer exakten Versuchsausführung. Eine Veröffentlichung von KUMAR und AXELROD (38) entspricht dieser Forderung sicherlich nicht, wenn die als "pair-weighted controls" bezeichneten Tiere um ca. 60 Prozent mehr wiegen als die entsprechenden Versuchstiere. Zudem sind Dauer und Intensität der Vorbehandlung von Bedeutung. In Versuch 3.1. hatten die Tiere präoperativ nicht mehr als 70 bis 78 Prozent ihres Ausgangsgewichts und wogen im Verhältnis zu den Kontrolltieren prozentual noch weniger. In keinem der anderen Experimente war der Allgemeinzustand der Tiere schlechter. Damit wurden die unspezifischen Begleiteffekte eines Pyridoxinmangels kalkulierbar.

Verlängerungen der mittleren Überlebensdauer von Hauttransplantaten, die unter Reduzierung des Allgemeinzustandes auftraten und die durch Nahrungskarenz erzielten Ergebnisse nicht deutlich übertrafen, waren somit wahrscheinlich nicht Folge einer spezifischen Behandlung.

Daß die fünftägige postoperative Behandlung in Versuch 3.1. zu einer Verlängerung der mittleren Abstoßungszeit von nur drei Tagen führte, spricht gegen eine quantitative Unterdrückung der zellulären Abstoßungsreaktion unter diesen Bedingungen.

Schließlich sollte man bedenken, daß bei einer starken, H-2-gebundenen Histoinkompatibilität lediglich durch Hunger und Gewichtsverlust kein oder ein wesentlich schwächerer immunsuppressiver Effekt aufgetreten wäre. Damit tritt bei der Beurteilung unterschiedlicher Befunde neben der Spezies die Art des Antigens in den Vordergrund.

Es sind uns keine Veröffentlichungen bekannt, in denen unseren Ergebnissen widersprechende, unter identischen Bedingungen gewonnene Befunde berichtet wurden. Wir müssen also bei der Bewertung von Behandlungserfolgen unspezifische, den Stoffwechsel der Versuchstiere global beeinflussende Faktoren berücksichtigen.

4.2. Vitamin-B₆-Mangel

Vitamin B₆ ist in der aktiven Form des Pyridoxalphosphats (PALP) am Stoffwechsel aller natürlichen Aminosäuren beteiligt (56). Es nimmt eine zentrale Stellung im Protein- und Stickstoffmetabolismus ein. Es fördert die enterale Resorption und den Transport von Aminosäuren über die Zellmembran, wandelt sie ineinander um, sorgt somit für die Bereitstellung eines für die Proteinsynthese notwendigen Aminosäuremusters und fördert die anabole Verwertung der Proteinbausteine (56). Bei einer mangelhaften Vitaminversorgung ist mit zahlreichen Störungen zu rechnen, von denen uns im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich die des Immunsystems beschäftigen.

Ein Vitamin-B₆-Mangelzustand läßt sich erzielen durch vitaminfreies Futter, Vitaminantagonisten und am wirkungsvollsten durch eine kombinierte Behandlung.

4.2.1. Alimentärer Pyridoxinmangel

In zwei Versuchen ließ sich zeigen, daß alimentäre Vitaminkarenz alleine keine nennenswerten Verlängerungen der mittleren Abstoßungszeiten von Hauthomotransplantaten innerhalb eines schwachen Histoinkompatibilitätssystems bewirken konnte.

In Versuch 3.2. resultierte aus einem leichten, jedoch signifikanten Vitaminmangel bei gering beeinträchtigtem Allgemeinzustand und mäßigem Gewichtsverlust von zehn Prozent keinerlei Wirkung. In Versuch 3.3. ließ sich unter starkem Pyridoxinmangel die mittlere Abstoßungszeit verlängern. Dieser Effekt kann jedoch angesichts des stark reduzierten Allgemeinzustandes der Mangeltiere (Gewichtsreduktion 20 Prozent) unter Berücksichtigung der in Versuch I durch alleinige Nahrungskarenz erzielten Erfolge nicht ausschließlich einer Vitamin-B₆-Verarmung zugeschrieben werden.

FISHER berichtet, unter ähnlichen Bedingungen an Ratten mit Hauthomotransplantaten wesentlich bessere Resultate erzielt zu haben (20, 22), von Versuchen an Mäusen ist uns Vergleichbares nicht bekannt.

4.2.2. 4'-Desoxypyridoxol (DB₆)

DB₆ ist der am gründlichsten untersuchte (33) und beinahe schon klassisch zu nennende Pyridoxinantagonist, welcher einen der stärksten Antivitamineneffekte aufweist.

In Kombination mit vitaminfreiem Futter bewirkt er in relativ kurzer Zeit einen Pyridoxinmangel. Neben den biochemisch nachweisbaren Veränderungen ruft er bei Mäusen Gewichtsabnahme, entzündliche Veränderungen des gesamten Integuments,

insbesondere schuppende Dermatitiden an Schnauze, Schwanz und Pfoten, hervor. Die gleichen Symptome treten unter rein alimentärem Vitaminmangel, wenngleich erst nach wesentlich längerer Behandlungsdauer, ebenfalls auf (52).

Die in Versuch 3.5. beobachteten Erfolge eines prolongierten postoperativen Pyridoxinmangels sind Ausdruck einer wirklichen temporären Immunsuppression, die eine der postoperativen Therapiedauer beinahe proportionale Hinauszögerung der Abstoßungserscheinungen bewirkte. Sogar entzündlich vorgeschädigte Homotransplantate (Gruppe II) vermochten sich noch unter ihrer Nachwirkung zu erholen, als den Tieren schon wieder Vitamin B₆ zugeführt wurde.

Die Latenzdauer von zehn Tagen zwischen erstmaliger postoperativer Vitamin-B₆-Zufuhr und dem Auftreten von Abstoßungszeichen in Versuch 3.5. läßt den Schluß zu, daß in diesem System nicht H-2-gebundener Histoinkompatibilität das Immunsystem, soweit klinisch morphologisch beurteilbar, vorübergehend vollkommen ausgeschaltet werden konnte.

Dieser Effekt war jedoch an die Präsenz eines Pyridoxinmangels gebunden. Die von FISHER aufgestellte These (20), wonach eine Immunsuppression während einer sogenannten "kritischen Phase" anschließend zu dauerhafter Toleranz trotz Vitamin-B₆-Zufuhr führe, mag für gewisse Rattenstämme Gültigkeit besitzen - Allgemeingültigkeit kommt ihr nach unseren Ergebnissen nicht zu.

Im Zusammenhang mit dem Vitaminantagonisten stellt sich die Frage, ob DB₆ im Vergleich zu alimentärem Pyridoxinmangel lediglich quantitativ unterschiedliche Wirkungen hat oder ob man ihm selektive Wirkungen zuschreiben muß. Für die erste Möglichkeit sprechen die Befunde von AXELROD (5), STOERCK (52) und FISHER (20), denen zufolge sich zahlreiche, durch DB₆ erzielte Effekte durch Pyridoxinzufuhr rückgängig machen lassen.

bei weiblichen Mäusen vom Stamm C57Bl/6J Toleranz gegenüber Hauttransplantaten von männlichen Tieren desselben Stamms zu erzielen. Eine intraperitoneale Injektion von ca. 50 Mio. Spendermilzzellen bewirkte Toleranz in zehn bis 46 Prozent. Bestand jedoch zum Zeitpunkt der Milzzellinjektion ein mit DB₆ induzierter Pyridoxinmangel, dann waren 86 bis 100 Prozent dauerhaft vor Abstoßung geschützt. Zum Zeitpunkt der Transplantation bestand bei den Empfängertieren kein Pyridoxinmangel.

Diese überaus positiven Ergebnisse konnten wir nicht erzielen. Milzzellen allein zeigten keine Wirkung, wohingegen die Kombinationsbehandlung bei 18 Prozent der Tiere zu dauerhafter Toleranz führte.

4.4. Vitamin-B₆-Status

Wir beurteilten die Vitaminversorgung der Tiere anhand der Aktivität und Aktivierbarkeit der erythrozytären GOT. Wie bereits geschildert, wirkt sich ein Vitamin-B₆-Mangel auf verschiedene Enzyme unterschiedlich aus. So sind einem Vitamin-B₆-Defizit gegenüber die Enzyme, welche schwefelhaltige Aminosäuren metabolisieren, mehr, Lebertransaminasen weniger empfindlich (19). Es können sogar gleiche Enzyme, lediglich in verschiedenen Geweben unterschiedlich stark von einer mangelhaften Vitaminversorgung betroffen sein (57). Somit sind die Funktionen der einzelnen Gewebe bzw. Organe auf Grund unterschiedlicher Enzymmuster bei einem Pyridoxinmangel nicht gleichmäßig beeinträchtigt.

Untersuchungsmethoden, die auf Messungen des Vitamingehalts in einem Gewebe (z.B. Erythrozyten) und der Reaktion eines einzigen Enzyms beruhen, mögen zur überschlagsmäßigen Beur-

teilung der Vitaminversorgung des gesamten Organismus geeignet sein. Alle Versuche, aus solchen Ergebnissen exakte Rückschlüsse auf die Vitaminversorgung irgendeines bestimmten Gewebes, z.B. lymphatischer Organe, zu ziehen, sind in Anbetracht dieser Zusammenhänge fragwürdig.

Es erscheint deshalb notwendig, will man den Zusammenhang zwischen Therapie und Wirkung genauer untersuchen, Methoden zu erarbeiten und anzuwenden, die eine direkte Bestimmung des Vitamingehalts in den einzelnen Geweben erlauben.

4.5. Technische Einflüsse

Vergleicht man Transplantationsergebnisse verschiedener Laboratorien, ist es unerläßlich, die technischen Voraussetzungen, unter denen sie zustande kamen, zu betrachten.

So spielt neben der Größe der Transplantate (20, 26) die Art der Spenderhaut eine wichtige Rolle, Es hat sich gezeigt (27), daß die dickere Haut von dunkel pigmentierten Tieren als Homotransplantat bis zu sieben Tagen länger überlebt als dünnere Albinohaut.

Eine Erhöhung der Raumtemperatur erhöht die Empfindlichkeit innerhalb schwacher Histoinkompatibilitätssysteme beträchtlich. Hypothermie dagegen kann bei nicht -H-2- differentiellen Systemen, wie wir sie verwendeten, die mittlere Überlebensdauer um 17 Tage verlängern (37).

Schließlich ist die Fixationstechnik von Bedeutung. Dabei sind sowohl die Art (Naht, Clipse, Clipsringe) als auch die Dauer der Fixation wichtige Parameter (42). Bei idealer Kombination der beiden können sogar bei H-2 - Histoinkompatibilität Abstoßungsverzögerungen bis zu sieben Tagen erzielt werden.

Diese wenigen Beispiele mögen genügen, um den Einfluß unspezifischer Faktoren auf die Überlebensdauer von Fremdtransplantaten zu veranschaulichen.

4.6. Urämie

Eine typische Begleiterscheinung der chronischen Urämie ist die Unterdrückung immunologischer Prozesse:

so überleben Herz-, Haut- und Nierentransplantate länger (9, 12, 44, 46), stellen sich Lymphopenie (48), Thymusatrophie (13) und Abschwächung der Hautreaktionen, sowohl des verzögerten als auch des Soforttyps (36, 34) ein und läßt sich verminderte Antikörperbildung nach Immunisierung nachweisen (50, 53).

Als Korrelat zu den klinischen Erscheinungen zeigen die Lymphozyten urämischer Patienten in der gemischten Lymphozytenkultur auffälliges Verhalten: es lassen sich eine verminderte in vitro Überlebenszeit (13), eine erhöhte spontane Blastogenese (13) und eine verminderte Stimulationsfähigkeit nachweisen (41). Da Pyridoxinmangel und Urämie eine Reihe ähnlicher klinischer Symptome hervorrufen, untersuchte DOBBELSTEIN (14) an chronisch urämischen Patienten, die unter intermittierender Hämodialysebehandlung standen, den Vitamin-B₆-Status und gleichzeitig das Verhalten der Lymphozyten in der gemischten Lymphozytenkultur. Dabei ergab sich, daß 75 Prozent der untersuchten Patienten an einem biochemisch nachweisbaren Pyridoxinmangel litten. Unter längerer oraler Zufuhr von Pyridoxol-HCl konnte dieser bei allen Patienten beseitigt werden. Gleichzeitig erhöhten sich die vorher stark reduzierten Stimulationsraten der gemischten Lymphozytenkultur deutlich, ohne jedoch Normalwerte zu erreichen.

Es liegt der Schluß nahe, daß Pyridoxinmangel wenigstens teilweise zur größeren Immuntoleranz bei urämischen Patienten beiträgt (14), wenngleich der Entstehungsmechanismus des Vitaminmangels unbekannt ist.

4.7. Ausblick

Das hochgesteckte Ziel, mittels eines zeitlich begrenzten Vitaminmangels eine zeitlich unbegrenzte Immuntoleranz zu bewirken, erreichten wir in unseren Versuchen nicht. Dennoch sind die aus Tierexperimenten bekannten Ergebnisse überaus positiv. HODGES (32) fand am Menschen unter Pyridoxinmangel nur eine geringgradig verminderte Antikörperbildung gegen Tetanus- und Typhusantigene. Versuche von FISHER (21), am Menschen die Abstoßung von Hauthomotransplantaten mit Pyridoxinantagonisten zu unterdrücken, blieben ohne meßbaren Erfolg. Sicherlich wäre es falsch, aufgrund dieses negativen Befundes jede Hoffnung auf zukünftige therapeutische Möglichkeiten aufzugeben, da wir wissen, daß Hauttransplantate gegen Abstoßungsvorgänge empfindlicher und deshalb auch schwerer davor zu schützen sind als beispielsweise Nierentransplantate.

Daneben wäre es ein großer Fortschritt, neben den bekannten und wahrscheinlich noch für lange Zeit unentbehrlichen immunsuppressiven Substanzen weitere, wie z.B. 4'-Desoxypyridoxol zur Hand zu haben, deren Vorteil in der Möglichkeit rascher Reversibilität und exakter Steuerung läge.

Diese Aspekte lassen es lohnend erscheinen, die Zusammenhänge zwischen Vitamin-B₆-Stoffwechsel, Vitaminantagonisten und Immunsystem weiter zu untersuchen.

5. Zusammenfassung

Im Tierversuch wurde an Mäusen untersucht, wie sich Nahrungskarenz, Vitamin B₆-Entzug, Applikation des Vitamin B₆-Antagonisten 4'-Desoxypyridoxol sowie Injektionen homologer Milzzellen, einzeln oder kombiniert, auf die Lebensdauer von homologen Hauttransplantaten bei schwacher Histoinkompatibilität auswirken.

Zwölftägige Gewichtsreduktion auf 70 bis 80 Prozent des Ausgangsgewichts erzielte eine signifikante, wenn auch geringe Verlängerung der mittleren Abstoßungsdauer bei den behandelten Mäusen gegenüber den Kontrolltieren.

Ein rein alimentär induzierter Pyridoxinmangel hatte nur dann eine signifikante Verlängerung der mittleren Abstoßungsdauer zur Folge, wenn er mit einer erheblichen Reduzierung des Allgemeinzustandes und Gewichtabnahme einherging. Bei gutem Allgemeinzustand hatte ein biochemisch nachweisbarer Pyridoxinmangel keinen nachweisbaren immunsuppressiven Effekt.

Milzzellen der zukünftigen Hautspendertiere wurden den Empfängertieren während eines mit 4'-Desoxypyridoxol induzierten Vitamin-B₆-Mangelzustandes injiziert. 18 Prozent der so behandelten Tiere tolerierten die nach Pyridoxinsubstitution transplantierte Haut über einen Beobachtungszeitraum von mehr als einem Jahr.

Eine kontinuierliche Behandlung der Empfängertiere mit 4'-Desoxypyridoxol nach der Transplantation führte zu einer quantitativen Suppression der Abstoßungsvorgänge. Die mittleren Abstoßungszeiten korrelierten mit der Dauer der postoperativen Behandlung.

LITERATURVERZEICHNIS

1. AXELROD A.E., CARTER B.B., MC COY R.H., GEISINGER R.:
Circulating antibodies in vitamin-deficiency states:
Pyridoxin, Riboflavin, and Pantothenic acid deficiencies.
Proc. Soc. Exp. Biol. 66:137-140, 1947
2. AXELROD A.E., PRUZANSKY J.:
The role of vitamins in antibody production.
Vitam. Horm. 13: 1-27, 1955
3. AXELROD A.E., TRAKATELLIS A.C., BLOCH H., STINEBRING W.R.:
Effect of pyridoxine deficiency upon delayed hypersensi-
tivity in guinea pigs. J. Nutrition 79: 161-167, 1963
4. AXELROD A.E., TRAKATELLIS A.C.:
Induction of tolerance to skin homografts by administe-
ring splenic cells to pyridoxine deficient mice. Proc.
Soc. Exp. Biol. Med. 116:206-210, 1964
5. AXELROD A.E., TRAKATELLIS A.C.:
Relationship of pyridoxine to immunological phenomena.
Vitam. Horm. 22:591-607, 1964
6. AXELROD A.E.:
Immune processes in vitamin deficiency states. Amer.J.
Clin. Nutr. 24:265-271, 1971
7. BENDITT E.P., WISSLER R.W., WOOLRIDGE R.L., ROWLEY D.A.,
STEFFEE C.H.:
Loss of body protein and antibody production by rats on
low protein diets. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 70:240 ff,
1949
8. BRENT L., GOWLAND G.:
Induction of tolerance of skin homografts in immunologi-
cally competent mice. Nature 196:1298-1301, 1962

9. BRENT L.:
Tolerance and enhancement in organ transplantation.
Transplant. Proc. 4:363-368, 1972
10. CALDWELL E.F., Mc HENRY E.W.:
Arch. Biochem. Biophys. 45:97-104, 1953
11. CANNON P.R.:
The importance of proteins in resistance to infections.
J. Am. Med. Ass. 128:360 ff, 1945
12. DAMMIN J., COUCH N.P., MURRAY J.E.:
Prolonged survival of skin homograft in uremic patients.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 64:967-976, 1957
13. DANIELS J.C., SAKAI H., REMMERS A.R., SARLES H.E.,
FISH J.C., COBB E.K., LEVIN W.C., RITZMANN S.E.:
In vitro reactivity of human lymphocytes in chronic
uraemia: analysis and interpretation.
Clin. Exp. Immunol. 8:213-227, 1971
14. DOBBELSTEIN H., KÖRNER W.F., MEMPEL W., GROSSE-WILDE H.,
EDEL H.H.:
Vitamin B₆ deficiency in uremia and its implications for
the depression of immune responses. Kidney International
5:233-239, 1974
15. EDELMAN R., SUSKIND R., OLSON R.E., SIRISINHA S.:
Mechanisms of defective delayed cutaneous hypersensiti-
vity in children with protein-calorie malnutrition. Lancet
1973/ I 506
16. EICHWALD E.J., SILMSER C.R., WHEELER N.:
Ann. N.Y. Acad. Sci. 64:737, 1957
17. EICHWALD E.J., SILMSER C.R., WEISSMAN I.:
J. Natl. Cancer Inst. 20:563, 1958

18. EICHWALD E.J., LUSTGRAAF E.C.:
J. Natl. Cancer Inst. 26:1395, 1961
19. EMERSON G.A.:
Summary and comment on tissue changes in vitamin B₆
deficiency. Vitam. Horm. 22:655-658, 1964
20. FISHER B., AXELROD A.E., FISHER E.R., LEE S.H.,
CALVANESE N.:
The favorable effect of pyridoxine deficiency on skin
homograft survival. Surgery 44:149-167, 1958
21. FISHER B.:
Skin homografts in pyridoxine-deficient humans. Trans-
plant. Bull. 6:432-433, 1959
22. FISHER B., SCHEWE E.:
Further observations on skin homografts in pyridoxine
deficient animals. Ann.Surg. 155:457-464, 1962
23. FOLLIS R.H.:
"The pathology of nutritional disease". Charles C. Thomas,
Springfield, Illinois. 1948
24. FRENCH S.W.:
Effect of chronic ethanol ingestion on liver enzyme
changes induced by thiamine, riboflavin, pyridoxine, or
choline deficiency. J. Nutrition 88:291-302, 1966
25. GERSHOFF S.N., GILL T.J. SIMONIAN S.J., STEINBERG A.I.:
Some effects of amino acid deficiencies on antibody
formation in the rat. J. Nutrition 95:184-190, 1968
26. GUTTMANN R.D., AUST J.B.:
Acquired tolerance to homografts produced by homologous
spleen cell injection in adult mice.
Nature 192:564-565, 1961

27. HARGIS B.J., WYMAN L.C., MALKIEL S.:
Skin transplantation in pyridoxine-deficient mice.
Arch. Allergy Appl. Immunol. 16:276-287, 1960
28. HARMON B.G., MILLER E.R., HOEFER J.A., ULLREY D.E.,
LUECKE R.W.:
Relationship of specific nutrient deficiencies to anti-
body production in swine. Pantothenic acid, pyridoxine
or riboflavin. J. Nutrition 79:269-275, 1963
29. HAUSCHKA T.S.:
Transplantation Bull. 2: 154, 1955
30. HAUSCHKA T.S., GRINELL S.T., MEAGHER M., AMOS D.B.:
Genetics and Cancer 271. Texas University Press, Austin.
Texas. 1959
31. HERR N.G., COURSIN D.B.:
Chronic skin homograft rejection in vitamin-B₆-deficient
mice. J. Nutrition 88:273-283, 1966
32. HODGES R.E., BEAN W.B., OHLSON M.A., BLEILER R.E.:
Factors affecting human antibody response. Amer. J. Clin.
Nutrition 11:180-199, 1962
33. HOLTZ P., PALM D.:
Pharmacological aspects of vitamin B₆. Pharm. Reviews
16 : 113-178, 1964
34. HUBER H., PASTNER D., DITTRICH P., BRAUNSTEINER H.:
In vitro reactivity of human lymphocytes in uraemia-a
comparison with the impairment of delayed hypersensitivity.
Clin. Exp. Immunol. 5:75-82, 1969
35. JOHNSTON F.A., WHITE S.L., HALSEY M.L.:
Effect of deoxypyridoxin on the amount of pyridoxal
phosphate in the livers and leukocytes of rats and on
leukocyte number, size, and type.
J. Nutrition 88:51-54, 1966

36. KIRKPATRICK C.H.H., WILSON W.E.C., TALMAGE D.W.:
Immunologic studies in human organ transplantation.
J. Exp. Med. 119:727-740, 1964
37. KOHN H.I.:
Animal room temperature affects rejection of skin
grafts. Transplantation 15:259-260, 1972
38. KUMAR M., AXELROD A.E.:
Cellular antibody synthesis in vitamin B₆-deficient rats.
J. Nutrition 96:53-59, 1968
39. LITCHFIELD J.T.:
A method for rapid graphic solution of time-per cent
effect curves. J.Pharm. Exp. Therap. 97:399-408, 1949
40. LUDOVICI P.P., AXELROD A.E., CARTER B.B.:
Circulating antibodies in vitamin-deficiency states.
Pantothenic acid and pyridoxine deficiencies. Proc. Soc.
Exp. Biol. 76:665-670, 1951
41. MADL W., SCHMIDT P., KOTZAUREK R., HONETZ N.:
Lymphocytenstimulierbarkeit bei chronisch intermittie-
render Hämodialyse. Wiener Klinische Wochenschrift
Jg. 83 49:893-894, 1971
42. MARKLEY K., THORNTON S.W.:
Skin graft prolongation caused by changes in grafting
procedure. Transplantation 16:80-82, 1973
43. MARTINEZ C., SMITH J.M., BLAESE M., GOOD R.A.:
Production of immunological tolerance in mice after
repeated injections of disrupted spleen cells. J.Exp.Med.
118:743-759, 1963
44. MORRISON A.B., MANESS K., TAWES R.:
Skin homograft survival in chronic renal insufficiency.
Arch. Pathol. 75:139-143, 1963

Ich möchte allen, die beim Zustandekommen der vorliegenden Arbeit mitgewirkt haben, herzlich danken; insbesondere Herrn Priv.-Doz.Dr. H. Dobbelstein für seine umfassende 'doktorväterliche' Betreuung, Herrn Priv.-Doz.Dr. G. Thoenes für zahlreiche Anregungen und seine Unterstützung bei den experimentellen Arbeiten, Frau Schubert für ihre technische Assistenz, Herrn Dr. Körner (Hoffmann - La Roche Basel) für die Vitamin-B₆-Bestimmungen.

L e b e n s l a u f

Geboren: 12.11.1948 in München

Eltern: Edmund Baumgärtner, kaufmännischer Angestellter in
München

Josefine Nunner, geb. Watzlwick, gest. 1949

Schulbildung: 1955 - 59 Volksschule a.d. Flurstr. München
1959 - 61 Maria Theresia Oberrealschule München
1961 - 68 Max Planck Gymnasium München
1968 Abitur

Studiengang: 1968 - 74 Elf Semester Studium der Humanmedizin
und Staatsexamen an der Ludwig-Maximilians-
Universität München

Tätigkeiten: Okt. 1974 - März 1975 Medizinalassistent am
Kreiskrankenhaus Bad Aibling, Abt. Chirurgie
Mai 1975 - August 1975 Medizinalassistent an
der Dermatologischen Klinik d. Univ. München
Sept. 1975 - Feb. 1976 Medizinalassistent an
der I. Medizinischen Klinik d. Univ. München
März 1976 Einberufung zur Bundeswehr zur Ablei-
stung des Grundwehrdienstes als Stabsarzt

Approbation: 2. Januar 1976

Familienstand: Seit 1972 verheiratet mit Karin Bachhäubl,
grad. Betriebswirtin
Feb. 1976 Geburt unserer Tochter Sandra

